家蚕丝素 P25 蛋白基因启动子顺式作用元件的功能分析

汪生鹏[1,2,*]，孙 霞[2]，沈小绢[2]，彭 伟[2]，郭锡杰[1,2]
（1. 中国农业科学院蚕业研究所，农业部蚕桑遗传改良重点开放实验室，江苏镇江 212018；
2. 江苏科技大学生物与环境工程学院，江苏镇江 212018）

摘要：为了阐明蚕丝蛋白基因表达调控的分子机制，利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统及实时荧光定量 PCR 等技术，对家蚕 *Bombyx mori* 丝素 *P25* 基因启动子上游 1 233 bp 的活性及其调控元件的功能进行了分析。结果表明：在 *P25* 启动子上游 -423 ~ -1 233 区和 -127 ~ -238 区存在正调控元件，在 -238 ~ -423 区段存在负调控元件；PSGF 和 BMFA 两结合元件在 *P25* 基因表达中起负调控作用。PSGF 结合元件对 *A3* 启动子在后部丝腺的活性具有一定的增强作用，进一步验证了 PSGF 调控元件的功能。通过对 *P25* 基因启动子的活性分析，尤其是对 PSGF 和 BMFA 调控元件的功能分析，有利于进一步了解 *P25* 基因表达调控的精细机制。

关键词：家蚕；丝素 P25 蛋白；启动子；顺式作用元件；Bac-to-Bac；实时定量 PCR
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2011)06-0623-11

Functional analysis of *cis*-acting elements of promoter of fibroin P25 gene in the silkworm, *Bombyx mori*

WANG Sheng-Peng[1,2,*], SUN Xia[2], SHEN Xiao-Juan[2], PENG Wei[2], GUO Xi-Jie[1,2] (1. The Key Laboratory of Silkworm and Mulberry Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China; 2. College of Biotechnology and Environmental Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China)

Abstract: To study the regulation mechanism of silk genes in the silkworm, *Bombyx mori*, the upstream 1 233 bp promoter sequence of fibroin *P25* gene and its regulatory elements were analyzed by using Bac-to-Bac expression system and real-time quantitative PCR technique. The results showed that there existed positive regulatory elements at position -423 to -1 233 and -127 to -238 in *P25* promoter region, and negative regulatory elements at position -238 to -423. PSGF and BMFA regulatory elements played a negative regulation role in *P25* expression. PSGF element had a certain degree of enhancement to *A3* promoter's activity in posterior silk glands, which further validates the function of PSGF regulatory element. Analysis of *P25* promoter activity, especially functional analysis of PSGF and BMFA regulatory elements, could be helpful in further understanding the mechanism of *P25* expression and fine regulation.

Key words: *Bombyx mori*; fibroin P25; promoter; *cis*-acting element; Bac-to-Bac; real-time PCR

家蚕 *Bombyx mori* 作为一种具有重要经济价值的昆虫，蚕丝是其经济价值最重要的表现形式。蚕丝主要由丝素和丝胶组成，其中丝素包括丝素重链（fibroin heavy chain, Fib-H）、丝素轻链（fibroin light chain, Fib-L）和 P25（fibroin 25 kD protein）3 种蛋白（Sprague, 1975; Couble *et al.*, 1983; Yamaguchi *et al.*, 1989），Fib-H，Fib-L 和 P25 蛋白三者以 6∶6∶1 的分子比组成丝素的基本结构单位，其中 P25 蛋白具有类似分子伴侣的作用，在丝素基本结构折叠过程中具有重要的作用（Tanaka *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2000）。蚕丝基因的表达在整个家蚕幼虫发育过程中具有明显的组织和发育时期特异性（Suzuki, 1994; Grzelak, 1995），其中顺式作用元件和反式作用因子间的相互作用在蚕丝基因的表达调控中具有

基金项目：国家重点基础性研究发展规划（“973”计划）项目(2005CB121004)；国家自然科学基金项目(30771631)；江苏省自然科学基金项目(BK2007099)；江苏省普通高校研究生科研创新计划(CX09S_001Z)
作者简介：汪生鹏，男，1971 年生，山东聊城人，副研究员，主要从事家蚕分子生物学研究，E-mail: spwangsri@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: spwangsri@163.com
收稿日期 Received: 2010-07-04；接受日期 Accepted: 2011-03-10

重要作用。几种蚕丝蛋白基因在表达调控上存在相似的调控元件和共同的反式作用因子，其中 *P25* 基因非常具有代表性，含有典型蚕丝基因调控元件，如 PSGF(posterior silk gland factor)、BMFA、SGFB (silk gland factor B)等，如图 1 所示。研究 *P25* 基因，尤其是启动子区的表达调控元件，对进一步分析 *P25* 基因的时空特异性表达具有重要作用，进而促进对蚕丝表达调控的研究。

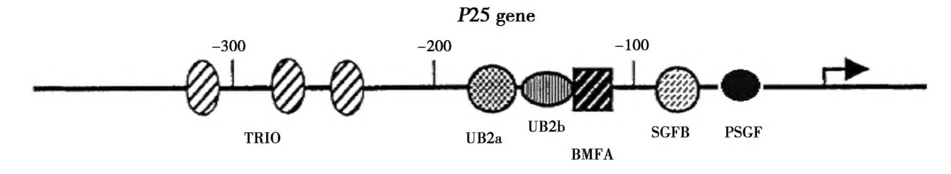


图 1 *P25* 基因的调控因子

Fig. 1 Regulation factors of *P25* gene

早期通过转基因方法鉴定了 *P25* 基因 5′侧翼区的 1 450 bp 能在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的唾液腺(与家蚕丝腺为同源器官)中特异表达，同时还发现 5′侧翼区的 254 bp 包含了控制这种特异性的序列(Durand *et al*., 1992; Grzelak, 1995; Nony *et al*., 1995; Horard *et al*., 1997)。利用体外 DNA 与蛋白质相互作用及合成 DNA 探针的方法鉴定了 BMFA 和 SGFB 调控因子(Durand *et al*., 1992)，前者为一遍在因子，可能参与蚕丝蛋白基因的负调控，且与基因的时期特异性表达相关，后者在中部丝腺和后部丝腺中均有发现，并且在 *P25* 启动子活性中具有重要作用。有研究将 SGFB 与 PSGF 结合元件连接在一起分析 *P25* 基因的启动子活性，发现这两元件的结合即可调控 β-半乳糖苷酶在后部丝腺中特异性表达(Horard *et al*., 1997)。通过以上早期研究结果可以看出，一系列顺式作用元件及与其相结合的调控因子在 *P25* 基因启动子的调控中起着非常重要的作用。

在本实验中利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统及荧光实时定量 PCR 等实验方法，对 *P25* 基因上游的 1 233 bp 区域进行分析，包括该区域一系列缺失对 *P25* 远上游调控区的活性影响、突变 PSGF 和 BMFA 结合元件后分析其功能及 PSGF 结合元件对 *actin* 3(*A3*)启动子的影响，通过以上实验分析，进一步了解 *P25* 基因表达调控的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用家蚕品种为 54A(日系，二化)，由中国农业科学院蚕业研究所提供。家蚕在 26℃条件下正常桑叶育。

克隆所用大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 Top10、菌株 DH10BacΔEGT、转移质粒 pFFa2、质粒 TEG11、Sf21 细胞均由本实验室保存。DH10BacΔEGT 含有的 AcMNPV Bacmid 的 *EGT* 基因(蜕皮激素 UDP 葡萄糖基转移酶基因)已被敲除(Guo *et al*., 2005); 转移质粒 pFFa2 来源于 pFastBacHTa(Invitrogen 公司)，其中的多角体蛋白启动子已被缺失；质粒 TEG11 含有编码加强型绿色荧光蛋白 EGFP 区段；质粒 piggyBacA3EGFP 含有 *A3* 启动子序列和 EGFP 报告基因序列(Tamura *et al*., 2000)。克隆载体 pGEM-T 购自 Promega 公司；常用限制性内切酶、rTaq/ExTaq DNA 聚合酶、T_4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。实验过程所用引物序列如表 1 所示，由上海生工生物技术服务公司合成。

1.2 *P25* 基因启动子相关序列的克隆

1.2.1 *P25* 基因启动子的克隆与截短：据有关研究，*P25* 基因启动子 5′侧翼区 1 450 bp 对该基因在后部丝腺中的特异性表达具有重要作用，因此克隆了 *P25* 基因启动子 5′侧翼区的 1 233 bp。根据其反式作用因子与其顺式作用元件结合位点将克隆的 *P25* 基因启动子区依次截短，分别在距转录起始位点的 -423，-238 和 -1 273 各位置进行截短(如图2)。在 -423 处的截短保留了已知的顺式作用元件，-238 处的截短将 TRIO 的结合序列去掉，-127处截短是在 BMFA 结合序列上进行的。将 4 个不同长度 *P25* 基因启动子片段分别接 EGFP 报告基因，最后克隆到转移质粒 pFFa2。

1.2.2 PSGF 和 BMFA 结合元件的突变：利用同尾酶 *Bam*HI 和 *Bgl*II 设计引物进行 PCR，采用拼接方法突变 PSGF 和 BMFA 结合元件，如图 3 所示。将突变了 PSGF、BMFA 结合元件的两启动子片段接入 *EGFP* 报告基因，最后克隆到转移质粒 pFFa2。

在 *P25* 启动子上游的 -127 ~ -238 区段间可能存在正调控元件，而相对于截到 -423 的活性仍然是升高，可能是由于 -238 ~ -423 区存在的负调控元件起的作用。各区段调控作用示意图如图 9 所示。

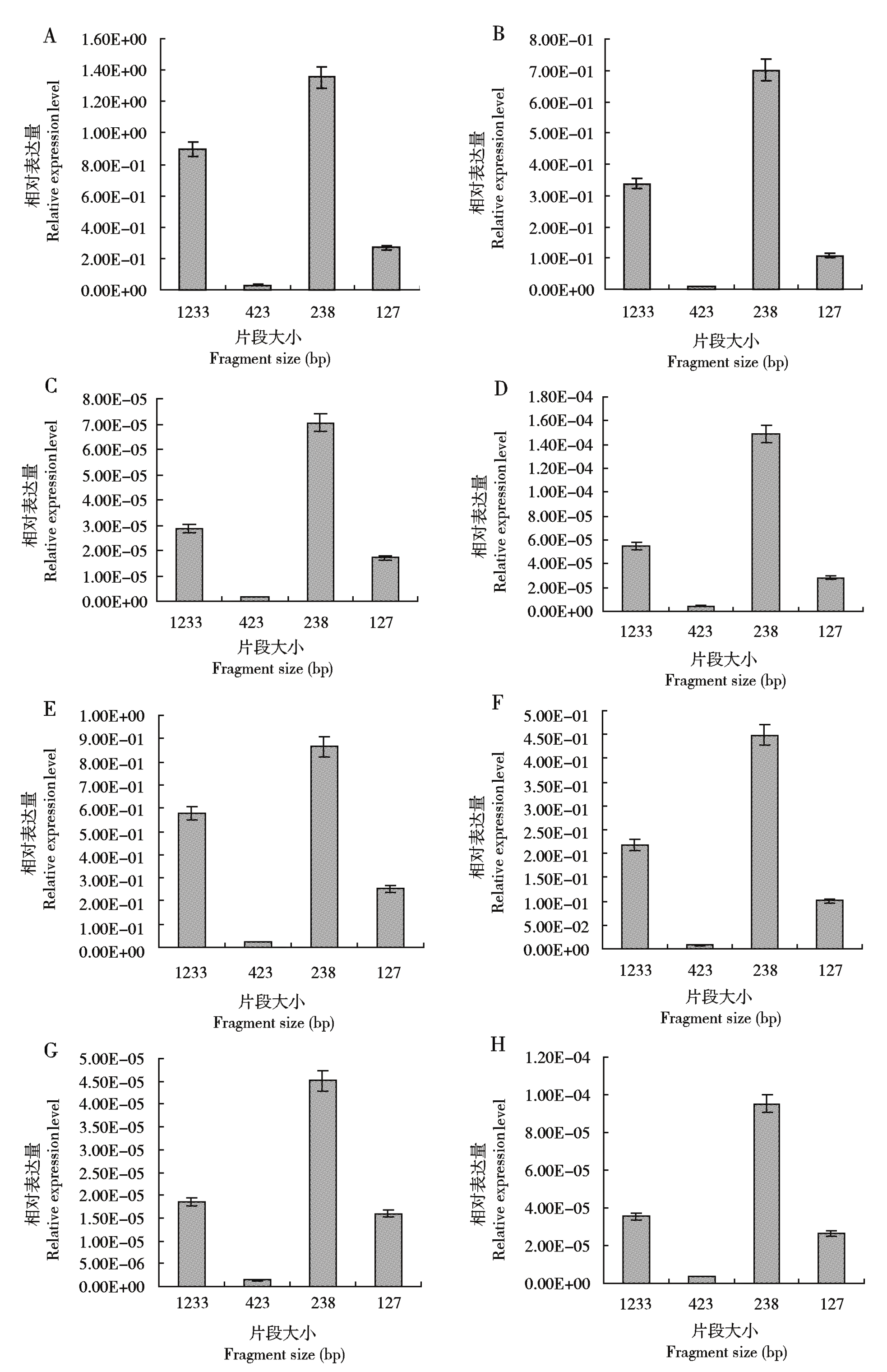


图 8　*P25* 基因远上游调控区对其活性影响的结果

Fig. 8　Impact of *P25* far upstream regulatory region to its activity

A: GAPDH-DA3; B: A3-DA3; C: 28S-DA3; D: 18S-DA3; E: GAPDH-DGAPDH; F: A3-DGAPDH; G: 28S-DGAPDH; H: 18S-DGAPDH. DA3: DNA 水平上以 *A3* 为内参基因 *A3* as the control gene at DNA level; DGAPDH: DNA 水平上以 *GAPDH* 为内参基因 *GAPDH* as the control gene at DNA level. 图 10 同 The same for Fig. 10.

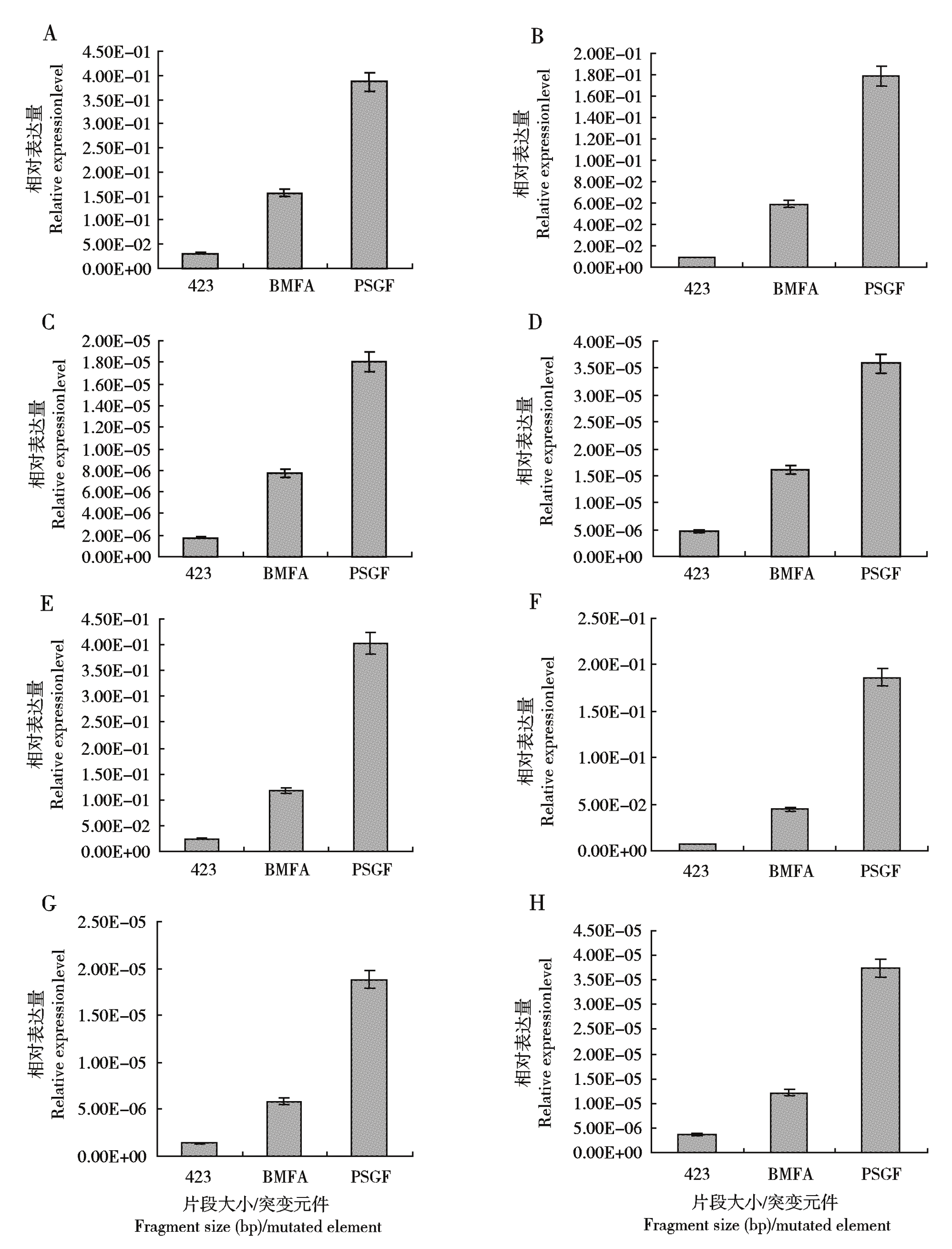


图 10 突变 PSGF 和 BMFA 结合元件对 *P*25 启动子活性的影响(后部丝腺)

Fig. 10 Results of the mutation of PSGF and BMFA elements in posterior silk glands of *Bombyx mori*

由实验结果可以看出，*P*25 启动子的活性由上游 -1 233截短到 -423 时明显下降，说明在 *P*25 启动子上游的 -423 ~ -1 233 区存在正调控元件，将其截掉之后导致其活性下降，由早期研究结果知道，*P*25 基因的顺式作用元件位于 5′端的 441 bp 内 (Durand *et al*., 1992)，而在截去的这段序列中没有发现明确的调控元件；将克隆的 -1 233 缩短到 -238时，其活性相对于截短到 -423 的活性明显升高，由此推测截掉的这一区段存在负调控元件，而这一区段在早期研究中鉴定了 3 个 TRIO 因子 (TRIOa，TRIOb 和 TRIOc) 的结合元件 (Žurovec *et al*., 1998)，该因子与其相应元件结合的功能并未明确，可能 3 个 TRIO 结合元件与此处的 *P*25 启动子活性升高有关；将克隆的 -1 233 缩短到 -127 时，其活性相对于截短到 -423 的活性仍然是增加，只是比截短到 -238 的活性低，推测在 *P*25 启动子上游的 -127 ~ -238 间存在正调控元件，在这一区段序列上已鉴定了 UB2a，UB2b 和 BMFA 结合元件,3 个相应的调控因子 UB2a，UB2b 和 BMFA 在家蚕中均为遍在因子，BMFA 可能参与蚕丝蛋白基因

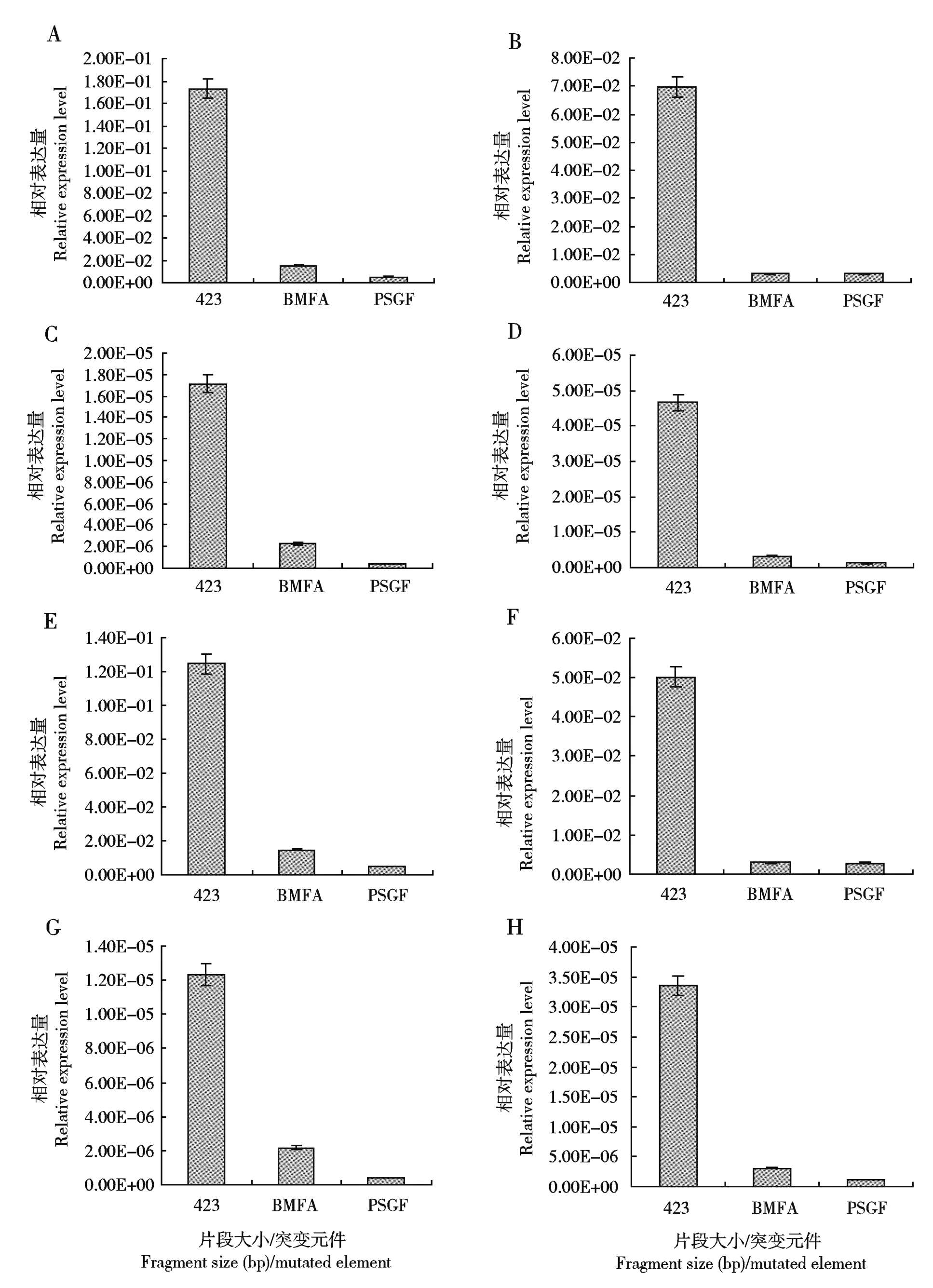


图 11　突变 PSGF 和 BMFA 结合元件对 *P*25 启动子活性的影响(脂肪体)

Fig. 11　Results of the mutation of PSGF and BMFA elements in the fat body of *Bombyx mori*

A：GAPDH-DA3；B：A3-DA3；C：28S-DA3；D：18S-DA3；E：GAPDH-DGAPDH；F：A3-DGAPDH；G：28S-DGAPDH；H：18S-DGAPDH. DA3：DNA 水平上以 *A3* 为内参基因 *A3* as the control gene at DNA level；DGAPDH：DNA 水平上以 *GAPDH* 为内参基因 *GAPDH* as the control gene at DNA level.

的负调控(Nony *et al*., 1995；Horard *et al*., 1997)，而 UB2a 和 UB2b 在家蚕丝基因表达调控中的作用还不明确，在这里 UB2a，UB2b 和 BMFA 3 个结合元件可能与 *P*25 启动子活性升高有关，具体是由哪一个元件引起有待于进一步研究分析。

3.3　PSGF 和 BMFA 结合元件具有负调控作用

以 *P*25 启动子上游截短到 -423 为对照，将 PSGF 和 BMFA 结合元件突变后分析两元件的功能。在后部丝腺中，突变 PSGF 和 BMFA 结合元件之后相对于 *P*25 启动子上游 423 bp 活性均提高，而在脂肪体中，三者活性变化趋势与在后部丝腺的正好相反，由以上实验结果推测 PSGF 和 BMFA 两结合元件在 *P*25 基因表达中起负调控作用，这与早期研究的 BMFA 可能参与丝蛋白基因负调控(Tsuda

表 3　A30 和 2PSGF-A3 在家蚕后部丝腺中活性比较

Table 3　Activity comparison of A30 and 2PSGF-A3 in posterior silk glands of *Bombyx mori*

校正基因 Correction gene	启动子 Promoter	内参基因 Reference gene			
		28S rRNA	18S rRNA	*A3*	*GAPDH*
A3	A30	$2.86\times10^{-7}\pm1.40\times10^{-7}$	$6.50\times10^{-7}\pm6.06\times10^{-7}$	$0.28\times10^{-2}\pm0.22\times10^{-2}$	$0.60\times10^{-2}\pm0.50\times10^{-2}$
	2PSGF-*A3*	$5.40\times10^{-7}\pm1.20\times10^{-7}$	$1.12\times10^{-6}\pm4.39\times10^{-7}$	$1.12\times10^{-2}\pm0.33\times10^{-2}$	$3.14\times10^{-2}\pm0.93\times10^{-2}$
	2PSGF-*A3*/A30	1.89	1.73	3.91	5.24
GAPDH	A30	$2.61\times10^{-8}\pm1.22\times10^{-8}$	$5.95\times10^{-8}\pm5.32\times10^{-8}$	$0.02\times10^{-2}\pm0.02\times10^{-2}$	$0.05\times10^{-2}\pm0.04\times10^{-2}$
	2PSGF-*A3*	$5.21\times10^{-8}\pm2.33\times10^{-8}$	$1.08\times10^{-7}\pm7.49\times10^{-8}$	$0.10\times10^{-2}\pm0.06\times10^{-2}$	$0.30\times10^{-2}\pm0.17\times10^{-2}$
	2PSGF-*A3*/A30	2.00	1.82	5.00	6.00

以报告基因对内参基因的相对表达量表示启动子活性；表 4 同。Promoter activity is indicated by the relative expression of reporter gene to reference gene. The same for Table 4.

表 4　A30 和 2PSGF-A3 在家蚕脂肪体中活性比较

Table 4　Activity comparison of A30 and 2PSGF-A3 in the fat body of *Bombyx mori*

校正基因 Correction gene	启动子 Promoter	内参基因 Reference gene			
		28S rRNA	18S rRNA	*A3*	*GAPDH*
A3	A30	$5.68\times10^{-7}\pm1.94\times10^{-7}$	$1.21\times10^{-6}\pm4.00\times10^{-7}$	$0.39\times10^{-2}\pm0.16\times10^{-2}$	$0.66\times10^{-2}\pm0.25\times10^{-2}$
	2PSGF-*A3*	$3.36\times10^{-7}\pm6.90\times10^{-8}$	$6.13\times10^{-7}\pm1.07\times10^{-7}$	$0.23\times10^{-2}\pm0.04\times10^{-2}$	$0.45\times10^{-2}\pm0.09\times10^{-2}$
	2PSGF-*A3*/A30	0.59	0.51	0.59	0.68
GAPDH	A30	$3.99\times10^{-7}\pm1.61\times10^{-7}$	$8.50\times10^{-7}\pm2.86\times10^{-8}$	$0.27\times10^{-2}\pm0.13\times10^{-2}$	$0.47\times10^{-2}\pm0.21\times10^{-2}$
	2PSGF-*A3*	$2.00\times10^{-7}\pm2.77\times10^{-8}$	$3.66\times10^{-7}\pm2.02\times10^{-9}$	$0.13\times10^{-2}\pm0.02\times10^{-2}$	$0.26\times10^{-2}\pm0.04\times10^{-2}$
	2PSGF-*A3*/A30	0.50	0.43	0.50	0.58

and Suzuki, 1981）的结果相一致。同时 PSGF 结合元件突变之后在脂肪体中活性相对于后部丝腺中的活性变得更弱，由此可以看出 PSGF 结合元件对于 *P25* 基因的后部丝腺特异性表达具有重要作用，分析其中原因，可能在脂肪体中缺少后部丝腺特异性因子或者缺少与 PSGF 因子相互作用的其他丝腺特异性因子，使其突变 PSGF 元件后在脂肪体中活性很弱。*P25* 基因在脂肪体中虽然存在一定程度的表达，但是表达量较低（孙霞等，2009），也由此可以推测这可能与脂肪体中缺少一些丝腺特异性因子有关。

3.4　PSGF 结合元件增强 *A3* 启动子在后部丝腺中的表达

在分析 PSGF 结合元件对 *A3* 启动子的调控作用中，以仅有 *A3* 启动子为对照，含加倍 PSGF 结合元件的 *A3* 启动子在后部丝腺和脂肪体中分别与之比较，在后部丝腺中，含加倍的 PSGF 元件的 *A3* 启动子与仅有 *A3* 启动子的相比较活性增加明显，而在脂肪体中两者的差别不是很明显，由此可以看出 PSGF 结合元件在对 *A3* 启动子在后部丝腺中的表达具有一定的增强作用。在早期研究 *P25* 基因的后部丝腺特异性表达中，发现仅有 SGFB 因子或者 PSGF 因子参与都不能控制这种特异性表达，而 SGFB 与 PSGF 两元件结合才能使 *P25* 基因在后部丝腺中特异性表达（Horard *et al*., 1997），所以仅取 PSGF 结合元件能否影响 *A3* 启动子表达的组织特异性还有待于进一步研究。另外本实验中使用了 *A3* 启动子，在后部丝腺中可能存在某些调控因子与之非特异结合，可能会影响到对 PSGF 结合元件的功能分析。另外 PSGF 调控因子除了与 *P25* 基因有相应的结合位点，在轻链基因上也存在其结合位点，因此 PSGF 结合元件可能在丝素基因的后部丝腺特异性表达中具有重要作用。

3.5　减小实验中的误差

在本实验对目的基因的研究中，主要利用的是报告基因 *EGFP* 在 mRNA 水平和 DNA 水平上的比较进行分析。实验过程中所提取的 RNA 和 DNA 取自同一家蚕的不同丝腺，样品间存在一定的差异；另外，亦有研究将对照基因与目的基因克隆到同一质粒（含有双荧光报告基因）上，同时比较 mRNA

与蛋白质水平上报告基因的表达（Zhang *et al*., 2009），从而进一步减少误差，在以后的实验过程中亦可尝试此方法，从而减少实验过程中的误差，以取得更为精确的实验结果。

参 考 文 献（References）

Couble P, Moine A, Garel A, Prudhomme JC, 1983. Developmental variations of a nonfibroin mRNA of *Bombyx mori* silkgland, encoding for a low-molecular-weight silk protein. *Dev. Biol*., 97: 398 –407.

Durand B, Drevet J, Couble P, 1992. P25 gene regulation in *Bombyx mori* silk gland: two promoter-binding factors have distinct tissue and developmental specificities. *Mol. Cell. Biol*., 12: 5768 –5777.

Grzelak K, 1995. Control of expression of silk protein genes. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 110: 671 –681.

Guo TQ, Wang JY, Guo XY, Wang SP, Lu CD, 2005. Transient *in vivo* gene delivery to the silkworm *Bombyx mori* by EGT-null recombinant AcNPV using EGFP as a reporter. *Arch. Virol*., 150: 93 –105.

Horard B, Julien E, Nony P, Garel A, Couble P, 1997. Differential binding of the *Bombyx* silk gland-specific factor SGFB to its target DNA sequence drives posterior-cell-restricted expression. *Mol. Cell. Biol*., 17: 1572 –1579.

Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, Kimura S, Ohtomo K, Mizuno S, 2000. Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem*., 275: 40517 –40528.

Nony P, Prudhomme JC, Couble P, 1995. Regulation of the *P25* gene transcription in the silk gland of *Bombyx*. *Biol. Cell*, 84: 43 –52.

Sprague KU, 1975. The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides. *Biochemistry*, 14: 925 –931.

Sun X, Zhu C, Wang SP, Shen XJ, Guo XJ, 2009. Quantitative analysis of fibroin genes' expression in silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 35: 30 –35. [孙霞，朱晨，汪生鹏，沈小绢，郭锡杰，2009. 家蚕丝素基因表达水平的定量分析. 蚕业科学，35: 30 –35]

Suzuki Y, 1994. Genes that are involved in *Bombyx* body plan and silk gene regulation. *Int. J. Dev. Biol*., 38: 231 –235.

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Maucham PB, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P, 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol*., 18: 81 –84.

Tanaka K, Inoue S, Mizuno S, 1999. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 29: 269 –276.

Tsuda M, Suzuki Y, 1981. Faithful transcription initiation of fibroin gene in a homologous cell-free system reveals an enhancing effect of 5′ flanking sequence far upstream. *Cell*, 27: 175 –182.

Wang SP, Lu CD, 2006. Leaked expression of cloned fibroin heavy chain promoter sequence in silkworm, *Bombyx mori*, and insect cultured cells. *Acta Sericologica Sinica*, 32: 491 –496. [汪生鹏，陆长德，2006. 家蚕丝素重链启动子克隆片段在家蚕体内和昆虫培养细胞内的渗漏表达. 蚕业科学，32: 491 –496]

Yamaguchi K, Kikuchi Y, Takagi T, Kikuchi A, Oyama F, Shimura K, Mizuno S, 1989. Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. *J. Mol. Biol*., 210: 127 –139.

Zhang Y, Wei Z, Li YY, Chen Y, Shen W, Lu C, 2009. Transcription level of messenger RNA per gene copy determined with dual-spike-in strategy. *Anal. Biochem*., 394: 202 –208.

Žurovec M, Yang C, Kodrík D, Sehnal F, 1998. Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. *J. Biol. Chem*., 273: 15423 –15428.

（责任编辑：赵利辉）